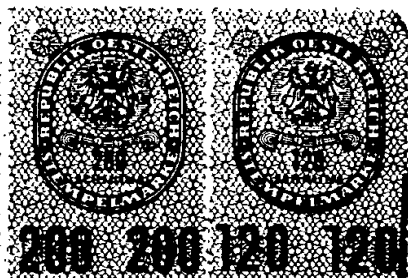
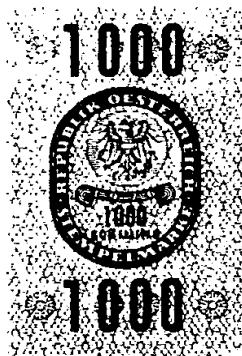


ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
WIEN I., KOHLMARKT 8-10

REC'D 0 9 SEP 1991

WIPO PCT



Geschäftszahl A 1110/90

PRIORITY DOCUMENT

Vom Österreichischen Patentamt wird hiemit bestätigt, daß

die Firmen BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH 6507
Ingelheim, Bundesrepublik Deutschland, Binger Straße 173
und GENENTECH, INC. South San Francisco, California 94080
(USA) 460 Point San Bruno Boulevard,
am 18. Mai 1990 um 11 Uhr 03 Minuten eine

Patentanmeldung, betreffend

" Neue Protein-Polykation-Konjugate " ,

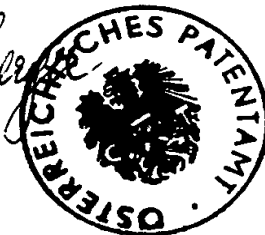
überreicht haben und daß die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnung en
mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten Beschreibung samt
Zeichnung en vollkommen übereinstimmt.

Österreichisches Patentamt

Wien, am 9. August 1991

Der Präsident:

i.A.

KITTENBERGER
FACHINSPEKTOR

OSTERREICHISCHES PATENTAMT
Hilfsämterdirektion

800 S Kanzleigeühr
bezahlt.

4

A 1110/90-1

Unext

1

Case 14/005

DI Farn/Ste

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
6507 Ingelheim (BRD)

GENENTECH, INC.
South San Francisco, California 94080 (USA)

Neue Protein-Polykation-Konjugate

113

Die Erfindung betrifft neue Protein-Polykation-Konjugate für den Transport von zu Polykationen affinen Verbindungen, insbesondere Nukleinsäuren, in menschliche oder tierische Zellen.

Nukleinsäuren als therapeutisch wirksame Substanzen haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.

So haben sich Antisense RNAs und -DNAs als wirksame Mittel für die selektive Inhibierung bestimmter Gensequenzen erwiesen. Ihre Wirkungsweise ermöglicht ihre Anwendung als Therapeutika zur Blockierung der Expression bestimmter Gene (wie deregulierter Onkogene oder viraler Gene) in vivo. Es wurde bereits gezeigt, daß kurze Antisense- Oligonukleotide in Zellen importiert werden und dort ihre inhibierende Wirkung ausüben können (Zamecnik et al., 1986), wenngleich ihre intrazelluläre Konzentration, u.a. wegen ihrer beschränkten Aufnahme durch die Zellmembran auf Grund der starken negativen Ladung der Nukleinsäuren, gering ist.

Ein weiterer Ansatz zur selektiven Inhibierung von Genen besteht in der Anwendung von Ribozymen. Auch hier besteht das Bedürfnis, eine möglichst hohe Konzentration von aktiven Ribozymen in der Zelle zu gewährleisten, wofür der Transport in die Zelle einer der limitierenden Faktoren ist.

Bedarf an einem effizienten System für das Einführen von Nukleinsäure in lebende Zellen besteht außerdem im Rahmen der Gentherapie. Dabei werden Gene in Zellen eingeschleust, um in vivo die Synthese therapeutisch wirksamer Genprodukte zu erzielen.

Es wurden bereits mehrere Lösungen vorgeschlagen, den Transport von Nukleinsäuren in lebende Zellen, der bei deren therapeutischer Anwendung einen der limitierenden Faktoren darstellt, zu verbessern.

Einer dieser Lösungswege besteht in direkten Modifikationen der Nukleinsäuren, z.B. durch Substitution der geladenen Phosphodiestergruppen durch ungeladene Gruppen. Eine weitere Möglichkeit der direkten Modifikation besteht in der Verwendung von Nukleosidanalogen.

Wenn auch einige dieser Vorschläge einen grundsätzlich vielversprechenden Ansatz der Lösung des Problems darstellen, weisen sie doch verschiedene Nachteile auf, z.B. geringere Bindung an das Zielmolekül, geringere Hemmwirkung, mögliche Toxizität.

Ein alternativer Ansatz zur direkten Modifikation der Oligonukleotide besteht darin, das Oligonukleotid als solches unverändert zu belassen und mit einer Gruppe zu versehen, die ihm die aufgestrebten Eigenschaften verleiht, z.B. mit Molekülen, die den Transport in die Zelle erleichtern.

Für die Gentransformation von Säugetierzellen in vitro sind verschiedene Techniken bekannt, deren Anwendbarkeit in vivo jedoch beschränkt ist (dazu zählen das Einbringen von DNA mittels Viren, Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion, Zellfusion, DEAE-Dextran oder die Calciumphosphat-Präzipitationsmethode).

Es wurde daher bereits versucht, ein in vivo anwendbares lösliches System zu entwickeln, das DNA zielgerichtet in die Zellen befördert (G.Y. Wu, C.H.

Wu, 1987). Dieses System wurde für Hepatozyten entwickelt und beruht auf dem Prinzip, Polylysin an ein Glykoprotein, auf das ein an der Hepatozytenoberfläche vorhandener Rezeptor anspricht, zu koppeln und daraufhin durch Zugabe von DNA einen löslichen Glykoprotein/Polylysin/DNA-Komplex zu bilden, der in die Zelle aufgenommen wird und nach Aufnahme des Komplexes in die Zelle die Expression der DNA-Sequenz ermöglicht.

Dieses System ist spezifisch für Hepatozyten und wird hinsichtlich seiner Funktion durch den relativ gut charakterisierten Aufnahmemechanismus durch den Asialoglykoproteinrezeptor definiert.

Ein breiter anwendbares, effizientes Transportsystem benutzt den Transferrinrezeptor für die Aufnahme von Nukleinsäuren in die Zelle mittels Transferrin-Polykation-Konjugaten. Dieses System ist Gegenstand der unveröffentlichten europäischen Patentanmeldung Nr. 90104700.1, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Es konnte gezeigt werden, daß Transferrin-Polykation/DNA-Komplexe effizient in lebende Zellen aufgenommen und internalisiert werden, wobei als Polykationanteil der Komplexe Polylysin verschiedenen Polymerisationsgrades und Protamin verwendet wurden. Mit Hilfe dieses Systems wurde ein das erbB-Onkogen inhibierendes Ribozymgen in erbB-transformierte Hühnerzellen eingebracht und die erbB inhibierende Wirkung nachgewiesen.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein für den Transport von Nukleinsäuren mit spezifischer Wirkung für CD4 exprimierende Zellen geeignetes System bereitzustellen.

T-Lymphozyten (T-Zellen) differenzieren im Thymus. Eine ihrer Aufgaben ist die Unterstützung der B-Zellen bei der Antigenantwort. Eine der Charakteristika von T-Zellen ist, daß sie kein freies Antigen erkennen, sondern Fragmente von Antigenen. T-Zellen erkennen ein solches Peptid-Antigen-Fragment auf der Oberfläche von Zielzellen durch einen T-Zell-Antigenrezeptor (TCR), der mit einem an ein MHC (major histocompatibility complex)-Molekül gebundenen Antigen in Wechselwirkung tritt. Die spezifische Antigenerkennung erfordert die Mitwirkung eines weiteren Rezeptors, CD4 oder CD8, mit nicht-polymorphen Regionen von MHC. Dieses Zusammenwirken von TCR und entweder CD4 oder CD8 mit einem MHC-Molekül auf Zielzellen ist für die Ausbildung der spezifischen Fähigkeiten von T-Zellen während der thymischen Entwicklung erforderlich und erlaubt die antigenspezifische Aktivierung reifer T-Zellen. T-Zellen, die mit Klasse I MHC Molekülen assoziiertes Antigen erkennen (vorwiegend Killerzellen), exprimieren CD8; Zellen, die Klasse II-assoziierte Antigene erkennen (vorwiegend Helferzellen), exprimieren CD4. Aufgaben von CD4⁺-Zellen im Rahmen der Immunantwort sind neben der Induktion der B-Zellfunktion die Aktivierung von Makrophagen, die Sekretion von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren für lymphoide Zellen, die Sekretion von Faktoren, die nicht-lymphoide Zellfunktionen induzieren, die Induktion der Suppressor-, der NK- und der cytotoxischen T-Zellfunktion (Fauci, 1988).

Neben seiner wichtigen Rolle bei der Immunerkennung spielt CD4, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 55.000, das außer auf T-Zellen auch in geringerem Ausmaß auf Monozyten/Makrophagen vorhanden ist, eine entscheidende Rolle bei der Infektion mit dem HIV-Virus, indem es als Rezeptor für das Virus fungiert.

HIV ist der Erreger von AIDS ("acquired immunodeficiency syndrome"), einer schweren Erkrankung, die mit einer progressiven und irreversiblen Schädigung des Immunsystems einhergeht. Diese wird vor allem durch eine selektive Verringerung von CD4⁺-T-Zellen hervorgerufen.

Seit seiner Entdeckung wurde das HIV-Virus eingehend hinsichtlich seiner molekularen Biologie, seiner Infektiosität und der Mechanismen der Pathogenese untersucht.

HIV ist ein RNA-Retrovirus, das ursprünglich HTLV-III, LAV oder ARV bezeichnet wurde. Das früher als HIV bezeichnete Virus wird derzeit häufig auch als HIV-1 bezeichnet, um es von einem in westafrikanischen Patienten nachgewiesenen Virus (HIV-2) zu unterscheiden, das Verwandtschaft zum SIV-Virus aufweist und ein von AIDS nicht unterscheidbares Krankheitsbild verursacht.

Das HIV-Virusgenom ist gut charakterisiert. Es weist eine Länge von ca. 10 kb auf und umfaßt die flankierenden LTR ("long terminal repeat") Sequenzen, die regulatorische Sequenzen für die Replikation enthalten, sowie mindestens neun Gene. Diese Gene umfassen nicht nur die allen replikationsfähigen Viren gemeinsamen gag, pol und env-Gene, sondern auch Gene, die an der Reifung und Morphogenese beteiligt sind (vpu und vif), Gene, beteiligt an der Regulation der Virusreplikation (tat, rev und nef) und ein Gen unbekannter Funktion (vpr). Das tat-Gen spielt eine wichtige Rolle bei der Amplifikation der Virusreplikation, indem es für ein Protein mit trans-Aktivatorfunktion für die HIV-Genexpression kodiert.

Nach seiner Bindung an das CD4-Molekül, das für HIV ein Rezeptor mit hoher Affinität ist (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; McDougal et al., 1986), wird das Virus in die Zelle aufgenommen und von seiner Hülle befreit. Zum Ablauf dieses Vorganges existieren widersprüchliche Ansichten. Es wurde u.a. vorgeschlagen, daß bei diesem Vorgang Rezeptor-vermittelte Endozytose eine Rolle spielt (Maddon et al., 1986; Pauza und Price, 1988). Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, daß für den Eintritt des Virus in die Zelle die Fusion des transmembranen Teils (gp41) der Virushülle mit der Zellmembran unabhängig vom pH-Wert erforderlich ist (Stéin et al., 1987). Weiters wurde beobachtet, daß humanes CD4 exprimierende Mauszellen trotz Bindung des Virus an die Zelle nicht produktiv infiziert werden können. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, daß außer CD4 gegebenenfalls noch andere Proteine auf humanen CD4⁺-Zellen für die Internalisierung des Virus mitverantwortlich sind.

Die Bindung des HIV-Virus an das CD4-Molekül erfolgt über das Virus-Hüllprotein (env).

Das Primärprodukt des env-Gens, gp160, ist ein Precursor, dessen Spaltung (während der Reifung auf dem Weg durch das ER und den Golgi-Apparat) die Virionproteine gp120 und gp41 ergibt. Die Spaltung von gp160 ist für die Fusion des Virus mit der Zelle und für die Infektiosität erforderlich. gp120 ist das äußere Hüll-Glycoprotein und auf der Außenseite der Membran infizierter Zellen und von Viruspartikeln vorhanden. Es weist keine Membran-Verankerungsdomäne auf und bleibt mit der Membran ausschließlich durch nichtkovalente Bindung mit gp41 verbunden. gp120 enthält die für die Bindung des Virus an den Rezeptor wesentliche Determinante. Die hochaffine Bindung

zwischen dem Virus und der Zellmembran wird durch Wechselwirkung zwischen einem Abschnitt von 40 Aminosäuren am C-Terminus von gp120 und einer Domäne nahe dem N-Terminus von CD4 vermittelt. Wenn auch zwischen den verschiedenen HIV-Stämmen erhebliche Unterschiede in den gp120 Sequenzen bestehen, sind die CD4-Bindungsdomänen zwischen HIV-1, HIV-2 und den verwandten SIV-Viren konserviert. Es wurden proteolytische Fragmente von 95 und 25 kDa isoliert, die offensichtlich domänenartige Unterteilungen von gp120 darstellen und an CD4 in gleicher Weise zu binden vermögen wie das ursprüngliche gp120 (Nygren et al.; 1988).

Über den Ablauf des Fusionsvorganges gibt es verschiedene Theorien; unbestritten ist jedoch die Schlüsselrolle von gp41 für diesen Vorgang. gp41 weist eine hydrophobe Sequenz mit starker Homologie zu Fusionssequenzen am N-Terminus von Transmembran-Proteinen anderer Viren auf. Es wurde beobachtet, daß die env-Proteine ein Oligomeres bilden, wobei möglicherweise ein allosterisches Rearrangement des Oligomeren auf der Virusmembran das Einbringen des gp41-N-Terminus in die Ziel-Zellmembran und die Fusion fördert (derselbe Effekt wird für die Syncytienbildung zwischen infizierten Zellen verantwortlich gemacht).

Einer der als aussichtsreich angesehenen Ansätze, die HIV-Infektion zu blockieren, ist die Neutralisierung durch eine lösliche, sekretierte Form des CD4-Antigens (Smith et al.; 1987), die um die Bindung an gp120 konkurriert.

Eine therapeutische Möglichkeit, nach bereits erfolgter HIV-Infektion des Organismus die noch nicht infizierten Zellen zu schützen bzw. die Aktivierung des latenten

Virus in den befallenden Zellen zu verhindern, besteht in der Verabreichung von die Virusreplikation inhibierenden Nukleinsäuremolekülen.

Für derartige therapeutische Anwendungen von Nukleinsäuren ist deren effiziente Aufnahme in die Zelle erforderlich.

Es wurde überraschend festgestellt, daß der vom HIV-Virus bei der Infektion benutzte Rezeptor, CD4, für den Transport von Nukleinsäure in die Zelle ausgenutzt werden kann, indem die zu importierende Nukleinsäure mit einem Protein-Polykation-Konjugat komplexiert wird, dessen Proteinanteil ein Protein mit der Fähigkeit ist, an CD4 zu binden, und CD4 exprimierende Zellen mit den erhaltenen Protein-Polykation/DNA-Komplexen in Berührung gebracht werden.

Die Erfindung betrifft somit neue Protein-Polykation-Konjugate, die befähigt sind, mit zu Polykationen affinen Verbindungen, insbesondere Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanalogen, Komplexe zu bilden, wobei der Proteinanteil ein Protein mit der Fähigkeit ist, an CD4 zu binden, so daß die gebildeten Komplexe in CD4 exprimierende Zellen aufgenommen werden.

Im folgenden werden Vertreter von Proteinen mit der Fähigkeit zur Bindung an CD4 als "CD4 bindendes Protein" oder "CD4BP" bezeichnet.

Gegenstand der Erfindung sind weiters CD4BP-Polykation/Nukleinsäure-Komplexe.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß DNA in Form der erfindungsgemäßen Komplexe effizient in CD4 exprimierende Zellen aufgenommen und

exprimiert wird, wobei die Aufnahme von DNA in die Zelle mit steigendem Konjugatgehalt zunahm..

Als CD4BPs können alle diejenigen monoklonalen Antikörper gegen CD4 bzw. Fragmente davon, die an CD4 binden, verwendet werden, z.B. Fab'-Fragmente (Pelchen-Matthews et al., 1989).

Dazu zählen monoklonale Anti-CD4-Antikörper, die ein gp120-Epitop aufweisen, das mit dem Virus um die Bindung an dieses Epitop zu konkurriert.

Anstelle konventioneller monoklonaler Antikörper bzw. deren Fragmente können CD4-Antigen bindende Antikörperabschnitte, bestehend aus einer Kombination von Segmenten der schweren und leichten Kette oder gegebenenfalls der schweren Kette allein, verwendet werden. Die Herstellung solcher "alternativer" Antikörper durch Klonierung mittels Polymerase-Kettenreaktion und Expression in E.coli wurde kürzlich beschrieben (Sastry et al., 1989; Orlandi et al., 1989; Chaudhary et al., 1990).

Als CD4BPs kommen weiters HIV-1-gp120 bzw. homologe Proteine verwandter Retroviren bzw. Fragmente davon in Betracht. Zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete gp120-Fragmente sind diejenigen, die zur Bindung an CD4 befähigt sind (Lasky et al., 1987), z.B die 95-kDa und 25-kDa-Fragmente, von denen nachgewiesen wurde, daß sie an CD4 binden (Nygren et al.; 1988). Solche Fragmente können z.B erhalten werden, indem entweder zunächst das gesamte gp120 Protein auf rekombinantem Weg hergestellt und anschließend proteolytisch gespalten wird. Eine alternative Methode besteht in der rekombinanten Herstellung der Fragmente selbst.

Das molare Verhältnis CD4BP:Polykation beträgt bevorzugt 10:1 bis 1:10, wobei zu berücksichtigen ist, daß es zur Ausbildung von Aggregaten kommen kann. Dieses Verhältnis kann jedoch bei Bedarf innerhalb weiterer Grenzen liegen, solange die Bedingung erfüllt ist, daß Komplexierung der Nukleinsäure(n) stattfindet und gewährleistet ist, daß der gebildete Komplex durch CD4 gebunden und in die Zelle befördert wird. Dies kann durch einfach durchzuführende Versuche von Fall zu Fall überprüft werden, z.B mit Hilfe von CD4+-Zelllinien, die mit den erfindungsgemäßen Konjugaten in Berührung gebracht werden und die daraufhin auf das Vorhandensein von Nukleinsäure in der Zelle untersucht werden, z.B. durch Southern Blot Analyse, Hybridisierung mit radioaktiv markierten komplementären Nukleinsäuremolekülen, durch Amplifikation mit Hilfe der PCR oder durch Nachweis des Genproduktes eines Reportergens.

Das jeweils gewählte Verhältnis richtet sich vor allem nach der Größe des Polykationmoleküls sowie nach der Anzahl und Verteilung der positiv geladenen Gruppierungen, Kriterien, die auf Größe, Struktur sowie allenfalls vorhandene Modifikationen der zu transportierenden Nukleinsäure(n) abgestimmt werden. Die Polykationen können gleich oder verschieden sein.

Als Polykationen können folgende Verbindungen verwendet werden:

- a) Protamine: Dabei handelt es sich um kleine (MG bis ca. 8000), stark basische Proteine, deren positiv geladene Aminosäurereste (vor allem Arginine) für gewöhnlich in Gruppen angeordnet sind und die auf Grund ihres polykationischen Charakters die

negativen Ladungen von Nukleinsäuren neutralisieren (Warrant et al., 1978). Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendbaren Protamine können natürlichen Ursprungs oder auf rekombinantem Weg hergestellt sein, wobei Mehrfachkopien hergestellt bzw. Modifikationen hinsichtlich Molekülgröße und Aminosäuresequenz vorgenommen werden können. Entsprechende Verbindungen können auch chemisch synthetisiert werden. Bei der Synthese eines künstlichen Protamins kann z.B. so vorgegangen werden, daß Aminosäurereste, die beim natürlichen Protamin Funktionen haben, die für die Transportfunktion unerwünscht sind (z.B. Kondensation von DNA) durch geeignete andere Aminosäuren ersetzt werden und/oder an einem Ende eine Aminosäure (z.B. Cystein) vorgesehen wird, die die gezielte Konjugation mit CD4BP ermöglicht.

- b) Histone: Dies sind im Chromatin vorhandene kleine DNA-bindende Proteine mit einem hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren (Lysin und Arginin), die sie befähigt, unabhängig von der Nukleotidsequenz an DNA zu binden und sie in Nukleosomen zu falten, wozu besonders die argininreichen Histone H3 und H4 geeignet sind (Felsenfeld, 1978). Bezüglich der Herstellung und der Modifikationen gilt grundsätzlich das für Protamine Gesagte.
- c) Synthetische Polypeptide, wie homologe Polypeptide (Polylysin, Polyarginin) oder heterologe Polypeptide (bestehend aus zwei oder mehr Vertretern positiv geladener Aminosäuren).

d) Nichtpeptische Kationen wie Polyethylenimine.

Die Größe der Polykationen wird bevorzugt so gewählt, daß die Summe der positiven Ladungen etwa 20 bis 500 beträgt, sie wird auf die zu transportierende Nukleinsäure abgestimmt.

Die erfindungsgemäßen Protein-Polykation-Konjugate können auf chemischem oder, falls das Polykation ein Polypeptid ist, auf rekombinantem Weg hergestellt werden. Die Kopplung auf chemischem Weg kann in für die Kopplung von Peptiden an sich bekannter Weise erfolgen, wobei, falls erforderlich, die Einzelkomponenten vor der Kopplungsreaktion mit Linkersubstanzen versehen werden (diese Maßnahme ist dann erforderlich, wenn von vornherein keine für die Kopplung geeignete funktionelle Gruppe, z.B. eine Mercapto- oder Alkoholgruppe, verfügbar ist. Bei den Linkersubstanzen handelt es sich um bifunktionelle Verbindungen, die zunächst mit funktionellen Gruppen der Einzelkomponenten zur Reaktion gebracht werden, worauf die Kopplung der modifizierten Einzelkomponenten durchgeführt wird.

Je nach gewünschten Eigenschaften der Konjugate, insbesondere im Hinblick auf deren Stabilität, kann die Kopplung erfolgen über

- a) Disulfidbrücken, die unter reduzierenden Bedingungen wieder gespalten werden können (z.B. bei Verwendung von Succinimidylpyridyldithiopropionat (Jung et al., 1981)).

- b) Unter biologischen Bedingungen weitgehend stabile Verbindungen (z.B. Thioether durch Reaktion von Maleimido-Linkern mit Sulfhydrylgruppen des an die zweite Komponente gebundenen Linkers).
- c) Unter biologischen Bedingungen labile Brücken, z.B. Esterbindungen, oder unter schwach sauren Bedingungen instabile Acetal- oder Ketalbindungen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate auf rekombinantem Weg bietet den Vorteil, genau definierte, einheitliche Verbindungen erhalten zu können, während bei der chemischen Kopplung Konjugat-Gemische entstehen, die aufgetrennt werden müssen.

Die rekombinante Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate ist nach für die Herstellung von chimären Polypeptiden bekannten Methoden durchführbar. Dabei können die polykationischen Peptide hinsichtlich ihrer Größe und Aminosäuresequenz variiert werden. Die gentechnologische Herstellung bietet auch den Vorteil, den CD4BP-Anteil des Konjugats modifizieren zu können, indem z.B. durch geeignete Mutationen die Bindungsfähigkeit an CD4 gesteigert werden kann oder ein CD4BP-Anteil, verkürzt auf den für die Bindung an CD4 maßgeblichen Teil des Moleküls, verwendet wird (z.B. Verwendung von gp120-Fragmenten oder "alternativer" Antikörper). Besonders zweckmäßig für die rekombinante Herstellung der erfindungsgemäßen Konjugate ist die Verwendung eines Vektors, der die für den CD4BP-Anteil kodierende Sequenz sowie einen Polylinker enthält, in den die jeweils benötigte für das polykationische Peptid kodierende Sequenz eingesetzt wird. Auf diese Weise kann ein Satz von Expressionsplasmiden erhalten werden, von dem bei Bedarf die gewünschte Sequenz

enthaltende Plasmid zur Expression des erfindungsgemäßen Konjugats herangezogen wird.

Bei den in die Zelle zu transportierenden Nukleinsäuren kann es sich um DNAs oder RNAs handeln, wobei hinsichtlich der Nukleotidsequenz keine Beschränkungen bestehen. Die Nukleinsäuren können modifiziert sein, sofern die Modifikation den polyanionischen Charakter der Nukleinsäuren nicht beeinträchtigt; zu diesen Modifikationen zählen z.B. die Substitution der Phosphodiestergruppe durch Phosphorothioate oder in der Verwendung von Nukleosidanalogen.

Bezüglich der Größe der Nukleinsäuren ermöglicht die Erfindung ebenfalls Anwendungen in einem weiten Bereich. Hinsichtlich der oberen Grenze besteht keine durch das erfindungsgemäße Transportsystem bedingte prinzipielle Limitierung, solange gewährleistet ist, daß die Protein-Polykation/Nukleinsäurekomplexe in die Zelle befördert werden. Eine etwaige Begrenzung nach unten ergibt sich aus anwendungsspezifischen Gründen, weil z.B. Antisense-Oligonukleotide unter etwa 10 Nukleotiden auf Grund zu geringer Spezifität kaum für die Anwendung in Frage kommen. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konjugate können auch Plasmide in die Zelle befördert werden.

Es ist auch möglich, gleichzeitig verschiedene Nukleinsäuren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konjugate in die Zelle zu befördern.

Beispiele für geeignete Nukleinsäuren sind die bereits angeführten Antisenseoligonukleotide oder Ribozyme mit Komplementarität zu für die Virusreplikation essentiellen Genabschnitten.

Bevorzugt als Nukleinsäureanteil der erfindungsgemäßen CD4BP-Polykation-Nukleinsäurekomplexe mit inhibierender Wirkung aufgrund von Komplementarität ist Antisense-DNA, Antisense-RNA oder ein Ribozym bzw. das dafür kodierende Gen. Bei der Anwendung von Ribozymen und Antisense-RNAs ist es besonders vorteilhaft, die dafür kodierenden Gene, bevorzugt zusammen mit einem Carriergen, einzusetzen. Durch die Einführung des Gens in die Zelle wird gegenüber dem Import der RNA als solcher eine beträchtliche Amplifikation der RNA und damit ein für die angestrebte Hemmung der biologischen Reaktion ausreichender Vorrat gewährleistet. Besonders geeignete Carriergene sind die für die Transkription durch Polymerase III erforderlichen Transkriptionseinheiten, z.B. tRNA-Gene. In diese können z.B. Ribozymgene derart eingefügt werden, daß bei Transkription das Ribozym Teil eines kompakten Polymerase III-Transkripts ist. Bezüglich geeigneter genetischer Einheiten, enthaltend ein Ribozymgen und ein von Polymerase III transkribiertes Carriergen, wird auf die unveröffentlichte europäische Patentanmeldung Nr. 90104701.9 Bezug genommen. Mit Hilfe des Transportsystems gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Wirkung dieser genetischen Einheiten verstärkt werden, indem eine erhöhte Ausgangskonzentration des Gens in der Zelle gewährleistet wird.

Als Zielsequenzen für die Konstruktion komplementärer Antisenseoligonukleotide oder Ribozyme bzw. der dafür kodierenden Gene, die bei der Therapie von AIDS zur Anwendung kommen können, sind grundsätzlich sämtliche Sequenzen des HIV-Gens geeignet, deren Blockierung die Inhibierung der viralen Replikation und Expression zur Folge hat. In erster Linie in Frage kommende Zielsequenzen sind Sequenzen mit regulatorischer Funktion, vor allem des tat-, rev- oder nef-Gens.

Geeignete Sequenzen sind weiters die Initiations-, Polyadenylierungs-, Splicing tRNA Primer-Bindungsstelle (PBS) der LTR-Sequenz oder die tar-Sequenz.

Außer Nukleinsäuremolekülen, die aufgrund ihrer Komplementarität zu viralen Genen inhibieren, können auch Gene mit anderem Wirkmechanismus eingesetzt werden, z.B. solche, die für Virusproteine, enthaltend sog. trans-dominante Mutationen, kodieren (Herskowitz, 1987). Die Expression der Genprodukte in der Zelle resultiert in Proteinen, die in ihrer Funktion das entsprechenden Wildtyp-Virusprotein dominieren, womit dieses seine für die Virusreplikation normalerweise geleistete Aufgabe nicht erfüllen kann und die Virusreplikation wirksam inhibiert wird. Geeignet sind grundsätzlich trans-dominante Mutanten von Virusproteinen, die für die Replikation und Expression erforderlich sind, z.B. Gag-, Tat- und Rev-Mutanten, von denen inhibierende Wirkung auf die HIV-Replikation nachgewiesen wurde (Trono et al., 1989; Green et al., 1989; Malim et al., 1989).

Vertreter therapeutisch wirksamer Nukleinsäuren sind weiters solche mit inhibierender Wirkung auf Onkogene.

Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung können auch Gene in die Zelle transportiert werden, deren Expressionsprodukte eine Funktion bei der Signalübertragung haben, um auf diese Weise die Signalübertragung in CD4+-Zellen, insbesondere T-Zellen, positiv zu beeinflussen und damit z.B. die Überlebensfähigkeit von T-Zellen zu steigern.

Prinzipiell sind sämtliche Gene im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet, die in CD4 exprimierenden Zellen, insbesondere T-Zellen, einen

therapeutischen oder gentherapeutischen Effekt haben.

Das Verhältnis Nukleinsäure: Konjugat kann innerhalb eines weiten Bereichs schwanken, wobei es nicht unbedingt erforderlich sein muß, sämtliche Ladungen der Nukleinsäure zu neutralisieren. Dieses Verhältnis wird von Fall zu Fall nach Kriterien wie Größe und Struktur der zu transportierenden Nukleinsäure, Größe des Polykations, Anzahl und Verteilung seiner Ladungen, derart einzustellen sein, daß ein für die jeweilige Anwendung günstiges Verhältnis zwischen Transportfähigkeit und biologischer Aktivität der Nukleinsäure besteht. Dieses Verhältnis kann zunächst grob eingestellt werden, etwa an Hand der Verzögerung der Wanderungsgeschwindigkeit der DNA in einem Gel (z.B. mittels "Mobility Shift" auf einem Agarosegel) oder durch Dichtegradientenzentrifugation. Nach Erhalt dieses vorläufigen Verhältnisses kann es zweckmäßig sein, im Hinblick auf die in der Zelle maximal verfügbare Aktivität der Nukleinsäure Transportversuche mit dem radioaktiv markierten Komplex durchzuführen und den Konjugat-Anteil gegebenenfalls derart zu reduzieren, daß die verbleibenden negativen Ladungen der Nukleinsäure dem Transport in die Zelle nicht hinderlich sind.

Die Herstellung der CD4BP-Polykation/Nukleinsäure-Komplexe kann nach in an sich für die Komplexierung polyionischer Verbindungen bekannten Methoden vorgenommen wurden. Eine Möglichkeit, unkontrollierte Aggregation bzw. Ausfällung zu vermeiden, besteht darin, die beiden Komponenten bei hoher Verdünnung ($\leq 100 \mu\text{g}$) zu mischen.

Gegenstand der Erfindung ist weiters ein Verfahren zum Einführen von Nukleinsäure(n) in menschliche oder

tierische Zellen, wobei bevorzugt ein unter physiologischen Bedingungen löslicher CD4BP-Polykation/Nukleinsäure-Komplex mit den Zellen in Berührung gebracht wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde als DNA-Komponente das Luciferase-Gen als Reporter-Gen verwendet. Aufgrund der in Vorversuchen erhaltenen Ergebnisse mit Transferrin-Polykation/DNA-Komplexen, in denen das Luciferase-Gen als Reportergen verwendet wurde, war gezeigt worden, daß aus der Effizienz des Imports des Luciferase-Gens auf die Anwendbarkeit anderer Nukleinsäuren geschlossen werden kann und die verwendete Nukleinsäure in qualitativer Hinsicht kein limitierender Faktor für die erfindungsgemäßen Komplexe ist.

Es kann für bestimmte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung vorteilhaft sein, Bedingungen zu schaffen, unter denen der Abbau der in die Zelle importierten Nukleinsäure verringert oder ausgeschaltet wird.

Bedingungen, unter denen der Abbau von Nukleinsäuren inhibiert wird, können durch Zusatz sog. lysosomatroper Substanzen geschaffen werden. Von diesen Substanzen ist bekannt, daß sie die Aktivität von Proteasen und Nukleasen in Lysosomen hemmen und somit den Abbau von Nukleinsäuren verhindern können (Luthmann u. Magnusson, 1983).

Zu diesen Substanzen zählen Chloroquin, Monensin, Nigericin, Ammoniumchlorid und Methylamin.

Das Erfordernis für die Anwendung einer Substanz aus der Gruppe der lysosomatropen Substanzen im Rahmen der

vorliegenden Erfindung richtet sich u.a. nach dem zu behandelnden Zelltyp oder bei Verwendung unterschiedlicher CD4BPs gegebenenfalls nach unterschiedlichen Mechanismen, über die die Aufnahme der Komplexe in die Zelle erfolgt. So wurde z.B. im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine unterschiedliche Beeinflussung des DNA-Imports in die Zelle durch Chloroquin bei Verwendung unterschiedlicher CD4BPs (monoklonale Anti-CD4-Antikörper oder gp120) festgestellt.

Es ist in jedem Fall notwendig, das Erfordernis bzw. die Eignung derartiger Substanzen im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Vorversuchen zu testen.

Gegenstand der Erfindung sind weiters pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend als wirksame Komponente eine oder mehrere therapeutisch oder gentherapeutisch wirksame Nukleinsäure(n), komplexiert mit einem CD4BP-Polykation-Konjugat (CD4BP-Polykation-Konjugat und Nukleinsäure können auch getrennt vorliegen und unmittelbar vor der therapeutischen Anwendung komplexiert werden).

Als therapeutisch wirksame Nukleinsäuren kommen die bereits angeführten Antisenseoligonukleotide oder Ribozyme bzw. die dafür kodierenden Gene oder für trans-dominante Mutanten kodierende Gene in Betracht, die inhibierende Wirkung auf in CD4+-Zellen enthaltene endogene oder exogene Gene oder Genprodukte haben. Darunter sind insbesondere diejenigen Gene zu verstehen, die aufgrund ihrer Sequenzspezifität (Komplementarität zu Zielsequenzen, Kodierung für trans-dominante Mutanten (Herskowitz, 1987)) eine intrazelluläre Immunität (Baltimore, 1988) gegen HIV bewirken und bei der Therapie des AIDS-Syndroms oder

zur Verhinderung der Aktivierung des Virus nach der Infektion verwendet werden können.

Die pharmazeutischen Zubereitungen können verwendet werden, um im menschlichen oder tierischen Organismus HIV oder verwandte Retroviren zu inhibieren. Ein Beispiel für die therapeutische Anwendung durch Inhibierung eines verwandten Retrovirus ist die Behandlung der proliferativen T-Zelleukämie, die durch das HTLV-1 Virus hervorgerufen wird.

Neben der Behandlung viraler T-Zelleukämien kommt für die Anwendung der vorliegenden Erfindung auch die Therapie nicht-viraler Leukämien in Betracht. Die Beteiligung von Onkogenen (abl, bcr, Ha, Ki, ras, rat, c-myc, N-myc) an der Entstehung lymphatischer Leukämien wurde in jüngster Zeit nachgewiesen; die Existenz weiterer Onkogene wird aufgrund von beobachteten spezifischen Chromosomentranslokationen für wahrscheinlich erachtet. Die Klonierung dieser Oncogene bietet die Grundlage für die Konstruktion oncogen-inhibierender Nukleinsäuremoleküle und damit für eine weitere therapeutische Einsatzmöglichkeit der vorliegenden Erfindung.

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die Gentherapie. Prinzipiell können im Rahmen der Gentherapie mit Hilfe der vorliegenden Erfindung all diejenigen Gene in CD4⁺-Zellen eingeführt werden, deren Expression in diesem Zelltyp einen therapeutischen Effekt erzielt, z.B. durch Substitution genetisch bedingter Defekte.

Figurenübersicht

- Fig.1: Import von anti-CD4-Polylysin/pRSVL-Komplexen in CD4⁺-CHO-Zellen
- Fig.2: Import von anti-CD4- oder gp120-Polylysin/pRSVL-Komplexen in CD4⁺-CHO-Zellen
- Fig.3: Import von gp120-Polylysin/pRSVL-Komplexen in CD4⁺-HeLa-Zellen

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele illustriert.

Beispiel 1

Herstellung von AntiCD4-Polylysin 90-Konjugaten

Die Kopplung erfolgte analog literaturbekannter Methoden durch Einführung von Disulfidbrücken nach Modifizierung mit Succinimidyl-Pyridyldithio-propionat (SPDP, Jung et al., 1981).

Eine Lösung von 1,7 mg antiCD4-Antikörper (OKT4A, Ortho Diagnostic Systems) in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,8 wurde mit 11 µl 10 mM ethanolischer Lösung von SPDP (Pharmacia) versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 100 mM HEPES-Puffer pH 7,3) wobei 1,4 mg antiCD4, modifiziert mit 75 nmol Pyridyldithiopropionatresten, erhalten wurden. Poly(L)lysin 90 (durchschnittlicher Polymerisationsgrad von 90 Lysinresten (Sigma), Fluoreszenzmarkierung mittels FITC) wurde analog mit SPDP modifiziert und durch Behandlung mit Dithiothreitol und nachfolgender Gelfiltration in die mit freien Mercaptogruppen

modifizierte Form gebracht.

Eine Lösung von 38 nmol Polylysin 90, modifiziert mit 120 nmol Mercaptogruppen, in 0,5 ml 20 mM Natriumacetatpuffer, wurde unter Sauerstoffausschluß mit oben angeführtem modifiziertem antiCD4 gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Gelpermeationschromatographie (Superose 12, 500 mM Guanidiniumhydrochlorid, pH 7,3); nach Dialyse gegen 25 mM HEPES pH 7,3 wurden entsprechende Konjugate, bestehend aus 1,1 mg antiCD4-Antikörper, modifiziert mit 11 nmol Polylysin 90, erhalten.

Beispiel 2

Herstellung von gp120-Polylysin 190-Konjugaten

Die Koppelung erfolgte analog literaturbekannter Methoden entweder durch Einführung von Disulfidbrücken nach Modifizierung mit Succinimidyl-Pyridyldithiopropionat im Falle der antiCD4-Konjugate) oder durch Thioether-Verknüpfung nach Modifizierung mit 6-Maleimidocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (EMCS, Sigma) (Fujiwara et al., 1981).

a) Disulfidverknüpfte gp120-Polylysin 190-Konjugate:

Eine Lösung von 3 mg rekombinantem gp120 (hergestellt nach der von Lasky et al., 1986, beschriebenen Methode) in 50 mM HEPES pH 7,8 wurde mit 7 µl 10 mM ethanolischer Lösung von SPDP versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtiert (Eluens 100 mM HEPES-Puffer pH 7,9) und man erhielt dabei 2,8 mg (23 nmol) rgp120, modifiziert mit 67 nmol Pyridyldithiopropionatresten. Eine Lösung von 6,6 nmol Polylysin 190,

fluoreszenzmarkiert und wie oben für die antiCD4-Konjugate beschrieben, modifiziert mit 23 nmol Mercaptogruppen, in 120 µl 30 mM Natriumacetat wurde unter Sauerstoffausschluß mit dem modifizierten rgp120 gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 5M NaCl auf einen Gehalt von ungefähr 0,6 M gebracht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia, 50mM HEPES pH 7,3, Salzgradient 0,6 M bis 3 M NaCl); nach Fraktionierung und Dialyse gegen 25 mM HEPES pH 7,3 wurden zwei Konjugatfraktionen A und B, bestehend aus 0,33 mg rgp120 modifiziert mit 1,3 nmol Polylysin 190 (im Falle der Fraktion A), bzw. 0,34 mg rgp120 modifiziert mit 3,2 nmol Polylysin 190 (Fraktion B) erhalten.

b) Thioether-verknüpfte gp120-Polylysin 190-Konjugate:

Eine Lösung von 2 mg rekombinantem gp120 in 0,45 ml 100 mM HEPES pH 7,9 wurde mit 17 µl einer 10 mM Lösung von EMCS in Dimethylformamid versetzt. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde über eine Gelsäule Sephadex G 25 filtriert (Eluens 100 mM HEPES-Puffer 7,9). Die Produktlösung (1,2 ml) wurde sogleich unter Sauerstoffausschluß umgesetzt mit einer Lösung von 9,3 nmol Polylysin 190, fluoreszenzmarkiert und wie oben (antiCD4-Konjugate) beschrieben modifiziert mit 30 nmol Mercaptogruppen (in 90 µl 30 mM Natriumacetat pH 5,0), und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 5M NaCl auf einen Gehalt von ca. 0,6 M gebracht. Die Isolierung der Konjugate erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia, 50mM HEPES pH 7,3, Salzgradient 0,6 M bis 3 M NaCl); nach Fraktionierung und Dialyse gegen 25 mM HEPES pH 7,3

wurden drei Konjugatfraktionen A, B und C erhalten, bestehend aus 0,40 mg rgp120 modifiziert mit 1,9 nmol Polylysin 190 (im Falle der Fraktion A), bzw. 0,25 mg rgp 120 modifiziert mit 2,5 nmol Polylysin 190 (Fraktion B), bzw. 0,1 mg rgp 120 modifiziert mit 1,6 nmol Polylysin 190 (Fraktion C).

Beispiel 3

a) Herstellung von Komplexen von CD4BP-Polykation-Konjugaten mit DNA

Die Komplexe wurden hergestellt, indem verdünnte Lösungen von DNA (30 µg/ml oder weniger in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,3) mit den in den vorangegangenen Beispielen erhaltenen CD4BP-Polylysin-Konjugaten (100 µg/ml oder weniger) vermischt wurden. Als DNA wurde pRSVL Plasmid-DNA (De Wet et al., 1987) verwendet, hergestellt mittels Triton-X Lyse Standard-Methode (Maniatis), gefolgt von CsCl/EtBr Gleichgewichtsdichtegradienten-Zentrifugation, Entfärbung mit Butanol-1 und Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA. Um ein Ausfällen der DNA-Komplexe zu verhindern, wurde phosphatfreier Puffer verwendet (Phosphate verringern die Löslichkeit der Konjugate).

b) Transfer und Expression von DNA in CD4⁺ CHO-Zellen

In diesem und den folgenden Beispielen wurde Plasmid-DNA, enthaltend das Photinus pyralis-Luciferase-Gen als Reporter-Gen, verwendet, um Gentransfer und Expression zu untersuchen. In den Figuren, die die Ergebnisse der Versuche darstellen, beziehen sich die dargestellten Werte für die Luciferase-Aktivität auf die Aktivität der gesamten Zellprobe.

CD4⁺ CHO-Zellen (Lasky et al., 1987) wurden zu 5×10^5 Zellen pro T-25-Flasche in Ham's F-12-Medium (Ham, 1965) plus 10 % FCS (fötales Kälberserum) ausgesät. 18 h später wurden die Zellen zweimal mit Ham's F-12-Medium ohne Serum gewaschen und in diesem Medium (5 ml) 5 h lang bei 37°C bebrütet.

Anti-CD4-Polylysin/pRSVL Komplexe wurden bei Endkonzentrationen von DNA von 10 µg/500 µl in 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5 hergestellt, wie in Beispiel 3 beschrieben. Anti-CD4-Polylysin 90 (8,4 nmol Polylysin/90 µg anti-CD4) wurde in den angegebenen Masse-Verhältnissen (von 1,9 bis 8,1, ausgedrückt als Masse von anti-CD4) eingesetzt. In den Proben 1 - 4 wurden die Komplexe den Zellen in Ham's F-12-Medium ohne Serum, enthaltend 100 µM Chloroquin zugefügt; in den Proben 5 und 6 wurde Chloroquin weggelassen. Nach einer 4stündigen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Medium plus 10 % FCS gewaschen und in diesem Medium inkubiert. In den Proben 5 und 6 wurde dasselbe Volumen an Serum enthaltendem Medium zu den Zellen gefügt. Nach 20 h wurden alle Zellen mit frischem, Serum enthaltendem Medium gewaschen und 48 h später geerntet. Aliquots von Extrakten (ca. 1/5 jeder Probe, entsprechend gleicher Proteinmenge, wurden auf Luciferase-Aktivität untersucht (De Wet et al., 1987). Die Biolumineszenz wurde unter Verwendung des Clinilumats (Berthold, Wildbach, BRD) gemessen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Fig.1 dargestellt. Es zeigte sich, daß DNA mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konjugate in CD4⁺-Zellen importiert wird und die importierte DNA exprimiert wird, wobei die Effizienz des DNA-Imports proportional dem anti-CD4/Polylysin-Gehalt ist.

Beispiel 4

Zunächst wurden CD4⁺ CHO-Zellen gezüchtet, wie in Beispiel 3b) angegeben. Konjugat/DNA -Komplexe, hergestellt wie in Beispiel 3a) angegeben, enthaltend 10µg pRSVL und entweder einen 2:1 oder 3:1 Massenüberschuß an antiCD4-Polylysin 90 (s. Beispiel 1) oder gp120 Polylysin 190 (s. Beispiel 2a) (wie in Fig.2 angegeben), wurden in Abwesenheit oder Gegenwart von 100µM Chloroquin den Zellen zugefügt. Nach weiteren 4 h bei 37°C wurden die Proben mit Chloroquin zweimal mit Ham's Medium, enthaltend 10% fötales Kälberserum gewaschen, während den Proben ohne Chloroquin 5 ml desselben Mediums zugefügt wurden. Die Zellen wurden weitere 20 h bei 37°C bebrütet und Aliquots auf Luciferaseaktivität untersucht, wie in Beispiel 3b) angegeben. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Fig.2.

Beispiel 5

CD4⁺HeLa Zellen (Maddon et al., 1986) oder normale HeLa-Zellen als Kontrolle in DME-Medium plus 10 % FCS wurden zu 6x10⁵ Zellen pro T25-Flasche ausgesät und anschließend gezüchtet, wie in Beispiel 3b) angegeben. Die Zellen wurden mit gp120-Polylysin/pRSVL-Komplexen bei den angegebenen Konjugat/DNA-Verhältnissen (Fig.3) in Berührung gebracht (bei den gp120-Polylysin-Konjugaten A, B und C handelt es sich um drei Fraktionen einer Mono S-Auftrennung des konjugierten Materials aus Beispiel 2b)). Das molare gp120 : Polylysin-Verhältnis jeder Fraktion ist in der Figur angegeben. Nach 4stündigem Kontakt mit den Konjugaten in Abwesenheit von Serum wurde Serum enthaltendes Medium zugesetzt und die Zellen nach 20 h geerntet. Aus den Zellextrakten wurden Aliquots, standardisiert auf gleichen Proteingehalt, auf Luciferase-Aktivität

untersucht. Die in der Figur angegebenen Werte entsprechen der Luciferase-Aktivität von 6×10^5 Zellen, transfiziert mit 6 μ g DNA.

Literatur:

- Baltimore D., 1988, Nature 335, 395
- Chaudhary V.K. et al., 1990, Proc.Natl.Sci.USA 87, 1066
- Dalgleish A.G. et al., 1984, Nature 312, 763
- De Wet et al., 1987, Mol.Cell.Biol. 7, 725-737
- Fauci A., 1988, Science 239, 617
- Felsenfeld et al., 1978, Nature 271, 115
- Fujiwara et al., 1981, J.Immunol.Meth. 45, 195
- Green M. et al., 1989, Cell 58, 215-223
- Ham R.G., 1965, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 53, 288
- Herskowitz I., 1987, Nature 329, 219
- Jung et al., 1981, Biochem.Res.Comm. 101, 599
- Klatzmann D. et al., 1984, Nature 312, 767
- Lasky et al., 1986, Science 233, 209-212
- Lasky et al., 1987, Cell 50, 975-985
- Luthmann und Magnussen, 1983, Nucl.Acids Res. 11 1295-1308
- Maddon P.J. et al., 1986, Cell 47, 333-348
- Malim M. et al., 1989, Cell 58, 205-214
- Maniatis, 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor
- McDougal J.S. et al., 1986, Science 231, 382
- Nygren A. et al., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85, 6543-6546
- Orlandi R. et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 3833-3837
- Pauza C.D. und Price T.M., 1988, J.Cell Biol. 107, 959-968
- Pelchen-Matthews et al., 1989, EMBO J. 8, 3641-3649
- Sastry L. et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 5728-5732
- Smith D.H. et al., 1987, Science 238, 1704-1707
- Stein B.S. et al., 1987, Cell 49, 659
- Trono D. et al., 1989, Cell 59, 113-120

Warrant R. et al., 1978, Nature 271, 130-135

Wu G.Y. und Wu C.H., 1987, J.Biol.Chem. 263,
14621-14624

Zamecnik et al., 1986, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83,
4143

Patentansprüche

1. Neue Protein-Polykation-Konjugate, die befähigt sind, mit zu Polykationen affinen Verbindungen, insbesondere Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanalogen, lösliche Komplexe zu bilden, die in menschliche oder tierische Zellen aufgenommen werden, dadurch gekennzeichnet, daß der Proteinanteil der Konjugate ein Protein mit der Fähigkeit ist, an CD4 zu binden, so daß die gebildeten Komplexe in CD4 exprimierende Zellen aufgenommen werden.
2. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ihr Proteinanteil ein monoklonaler Anti-CD4-Antikörper bzw. ein Fragment davon ist, das an CD4 bindet.
3. Konjugate nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der monoklonale Anti-CD4-Antikörper bzw. das Fragment davon ein gp120 bindendes Epitop aufweist.
4. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Proteinanteil HIV-1 gp120 bzw. ein homologes Protein verwandter Retroviren oder ein Fragment davon ist, das an CD4 bindet.
5. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein, gegebenenfalls modifiziertes, Protamin ist.
6. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein, gegebenenfalls modifiziertes, Histon ist.

7. Konjugate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ein synthetisches homologes oder heterologes Polypeptid ist.
8. Konjugate nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptid Polylysin ist.
9. Konjugate nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Polykation ca. 20 bis 500 positive Ladungen aufweist.
10. Konjugate nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis CD4 bindendes Protein : Polykation etwa 10 : 1 bis 1 : 10 beträgt.
11. Neue Protein-Polykation/Nukleinsäure-Komplexe, die in menschliche oder tierische Zellen aufgenommen werden, dadurch gekennzeichnet, daß der Proteinanteil ein Protein mit der Fähigkeit ist, an CD4 zu binden, so daß die Komplexe in CD4 exprimierende Zellen aufgenommen werden.
12. Komplexe nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Konjugat-Anteil eines der in den Ansprüchen 1 bis 10 definierten Konjugate enthalten.
13. Komplexe nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine virusinhibierende Nukleinsäure enthalten.
14. Komplexe nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäure enthalten, die Replikation und Expression des HIV-1 Virus oder verwandter Retroviren inhibiert.

15. Komplexe nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die inhibierende Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des HIV-1-Genoms aufweist.
16. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des tat-Gens aufweist.
17. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des rev-Gens aufweist.
18. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu Sequenzen des nef-Gens aufweist.
19. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zu LTR-Sequenzen aufweist.
20. Komplexe nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure Komplementarität zur tar-Sequenz aufweist.
21. Komplexe nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie als inhibierende Nukleinsäure ein Ribozym, gegebenenfalls zusammen mit einer Carrier-RNA, bzw. das dafür kodierende Gen enthalten.
22. Komplexe nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Nukleinsäure eine genetische Einheit, bestehend aus einem tRNA-Gen als Carrier-Gen und einem innerhalb dieses Gens angeordneten Ribozym-Gen enthalten.

23. Komplexe nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie als inhibierende Nukleinsäure ein, gegebenenfalls modifiziertes Antisense-Oligonukleotid, gegebenenfalls zusammen mit einer Carrier-Nukleinsäure, bzw. im Fall eines RNA-Oligonukleotids das dafür kodierende Gen enthalten.
24. Komplexe nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleinsäure, kodierend für ein Virusprotein, das eine trans-dominante Mutation aufweist, enthalten.
25. Komplexe nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Oncogen-inhibierende Nukleinsäure enthalten.
26. Komplexe nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Nukleinsäure ein therapeutisch oder gentherapeutisch wirksames Gen enthalten.
27. Verfahren zum Einführen von Nukleinsäure in CD4 exprimierende Zellen, wobei man aus einem in Anspruch 1 definierten Protein-Polykation-Konjugat und Nukleinsäure(n) einen, vorzugsweise unter physiologischen Bedingungen löslichen, Komplex bildet und CD4 exprimierende Zellen, gegebenenfalls unter Bedingungen, unter denen der Abbau von Nukleinsäure in der Zelle inhibiert wird, mit diesem Komplex in Berührung bringt.

28. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend als wirksame Komponente eine oder mehrere therapeutisch oder gentherapeutisch wirksame Nukleinsäure(n) in Form eines der in den Ansprüchen 11 bis 26 definierten Komplexe.

Zusammenfassung

Neue Protein-Polykation-Konjugate, die befähigt sind, mit zu Polykationen affinen Verbindungen, insbesondere Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanalogen, lösliche Komplexe zu bilden, enthalten als Proteinanteil ein Protein mit der Fähigkeit, an CD4 zu binden, so daß die gebildeten Komplexe in CD4 exprimierende Zellen aufgenommen werden. Komplexe für die Verwendung in pharmazeutischen Zubereitungen enthalten eine in CD4 exprimierenden Zellen, insbesondere T-Zellen, therapeutisch wirksame Nukleinsäure, z.B. das HIV-Virus inhibierende Antisenseoligonukleotide oder Ribozyme.

Fig.1

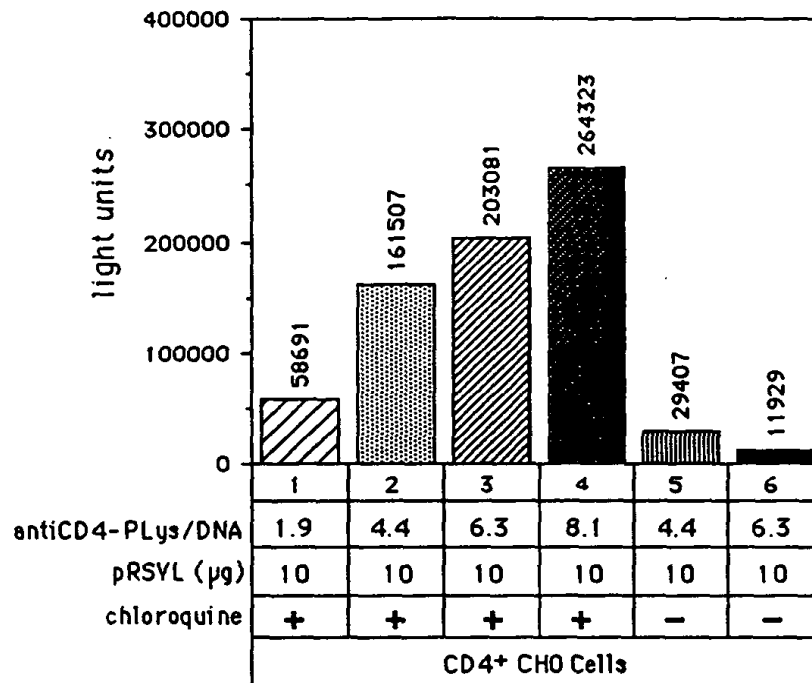


Fig.2

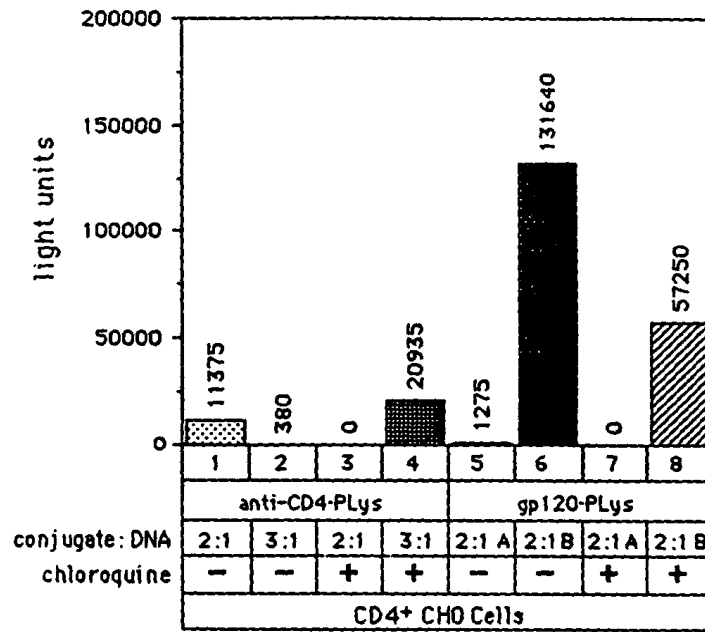


Fig.3

